

13

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
1. Mai 2003 (01.05.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 03/035083 A1

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: A61K 31/713,  
C12N 15/11, 15/88

(74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Dr. Gassner & Partner,  
Nägelsbachstrasse 49 A, 91052 Erlangen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/11972

(22) Internationales Anmeldedatum:  
25. Oktober 2002 (25.10.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

101 55 280.7	26. Oktober 2001 (26.10.2001)	DE
101 58 411.3	29. November 2001 (29.11.2001)	DE
101 60 151.4	7. Dezember 2001 (07.12.2001)	DE
PCT/EP02/00151	9. Januar 2002 (09.01.2002)	EP
PCT/EP02/00152	9. Januar 2002 (09.01.2002)	EP

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), curasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): RIBOPHARMA AG [DE/DE]; Fritz-Hornschuch-Strasse 9, 95326 Kulmbach (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): KREUTZER, Roland [DE/DE]; Glotzdorf 26, 95466 Weidenberg (DE). LIMMER, Stefan [DE/DE]; Gutenbergstrasse 9, 95512 Neudrossenfeld (DE). SCHUPPAN, Detlef [DE/DE]; Baumzeit 2, 91088 Bubenreuth (DE). JOHN, Matthias [DE/DE]; Kapellenstrasse 12, 96103 Hallstadt (DE). BAUER, Michael [DE/DE]; Mozartstrasse 54 b, 91052 Erlangen (DE).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht  
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 03/035083 A1

(54) Title: DRUG FOR TREATING A FIBROTIC DISEASE THROUGH RNA INTERFERENCE

(54) Bezeichnung: MEDIKAMENT ZUR BEHANDLUNG EINER FIBROTISCHEN ERKRANKUNG DURCH RNA INTERFERENZ

(57) Abstract: The invention relates to a drug for treating a fibrotic disease, said drug containing a double strand ribonucleic acid (dsRNA) suitable for inhibiting, through RNA interference, the expression of a gene involved in the formation of extracellular matrix.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Medikament zur Behandlung einer fibrotischen Erkrankung, wobei das Medikament eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) enthält, welche durch RNA-Interferenz zur Hemmung der Expression eines an der Bildung von Extrazellulärer Matrix beteiligten Gens geeignet ist.

## MEDIKAMENT ZUR BEHANDLUNG EINER FIBROTISCHEN ERKRANKUNG DURCH RNA INTERFERENZ

Die Erfindung betrifft ein Medikament und eine Verwendung zur  
5 Behandlung einer fibrotischen Erkrankung. Sie betrifft weiterhin eine doppelsträngige Ribonukleinsäure und deren Verwendung zur Herstellung eines Medikaments.

Unter einer fibrotischen Erkrankung wird hier ein Krankheits-  
10 bild verstanden, das gekennzeichnet ist durch ein Ungleichgewicht zwischen der Synthese Extrazellulärer Matrix (EZM) und deren Abbau. Das Ungleichgewicht führt dabei zu einer vermehrten Bildung und Ablagerung von Extrazellulärer Matrix bzw. Bindegewebe. Die EZM wird von Zellen vor allem aus Kollagenen, nicht kollagenen Glykoproteinen, Elastin, Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen gebildet. Die fibrotische Erkrankung kann beispielsweise eine Narbenbildung nach Verletzung eines inneren Organs oder der Haut sein, die über das Maß hinausgeht, das für eine Heilung erforderlich ist. Die  
15 übermäßige Bildung und Ablagerung Extrazellulärer Matrix kann zu Funktionsstörungen oder Versagen des betroffenen Organs, beispielsweise der Lunge, der Niere oder der Leber, führen. In der Niere wird EZM z.B. von Mesangialzellen und interstitiellen Fibroblasten gebildet. In der Leber sind es vor allem  
20 hepatische Sternzellen und portale Fibroblasten, welche für die Bildung der Extrazellulären Matrix verantwortlich sind. Die normalerweise ruhenden hepatischen Sternzellen können durch eine Schädigung, beispielsweise durch Toxine oder eine chronische Hepatitis, aktiviert werden. Die Folge ist deren  
25 Proliferation und deren Transdifferenzierung in Fibroblasten, welche einen Überschuss an Extrazellulären Matrixmolekülen produzieren. Versuche, die Synthese von Kollagen Typ I, einem wesentlichen Bestandteil der Extrazellulären Matrix, durch Antisinn-Oligonukleotide zu inhibieren, führten nur zu einer  
30 geringen Hemmung der Matrixproduktion. Ein wirkungsvolles molekularbiologisches Verfahren zur Hemmung der Matrixproduktion ist bisher nicht bekannt.

Aus der DE 101 00 586 C1 ist ein Verfahren zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle bekannt, bei dem ein Oligoribonukleotid mit doppelsträngiger Struktur in die Zelle  
5 eingeführt wird. Ein Strang der doppelsträngigen Struktur ist dabei komplementär zum Zielgen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es soll insbesondere ein  
10 wirksames Medikament und eine Verwendung zur Behandlung einer fibrotischen Erkrankung bereitgestellt werden. Weiterhin soll eine Verwendung zur Herstellung eines solchen Medikaments und ein zur Hemmung übermäßiger Bildung Extrazellulärer Matrix geeigneter Wirkstoff bereitgestellt werden.

15 Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 21, 22 und 43 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 20, 23 bis 42 und 44 bis 61.

20 Erfindungsgemäß ist ein Medikament vorgesehen, welches eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) enthält, welche durch RNA-Interferenz zur Hemmung der Expression eines an der Bildung von Extrazellulärer Matrix beteiligten Gens geeignet  
25 ist.

Eine dsRNA liegt vor, wenn die aus einem oder zwei Ribonukleinsäure-Strängen bestehende Ribonukleinsäure eine doppelsträngige Struktur aufweist. Nicht alle Nukleotide der dsRNA  
30 müssen kanonische Watson-Crick-Basenpaarungen aufweisen. Insbesondere einzelne nicht komplementäre Basenpaare beeinträchtigen die Wirksamkeit kaum oder gar nicht. Die maximal mögliche Zahl der Basenpaare ist die Zahl der Nukleotide in dem kürzesten in der dsRNA enthaltenen Strang.

35 Versuche zur Behandlung einer fibrotischen Erkrankung mittels Antisinn-Oligonukleotiden ließen einen molekularbiologischen

Ansatz wenig aussichtsreich erscheinen. Überraschenderweise hat sich jedoch gezeigt, dass es mittels doppelsträngiger Ribonukleinsäure möglich ist, die Neubildung von Bindegewebe bzw. EZM effektiv zu hemmen. Die an der Bildung von Extrazellulärer Matrix beteiligten Gene im Sinne der Erfindung sind auch solche Gene, welche zur Bildung von Faktoren führen, welche Zellen dazu veranlassen, Extrazelluläre Matrix zu produzieren oder in Extrazelluläre Matrix produzierende Zellen zu transformieren. Solche Faktoren sind z. B. der Plättchen-Wachstums-Faktor (PDGF), der transformierende Wachstumsfaktor  $\beta$  (TGF  $\beta$ ), insbesondere TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 oder TGF $\beta$ 3, der Bindegewebewachstumsfaktor (CTGF) oder Oncostatin M. Diese Faktoren können z.B. in der Leber eine Transdifferenzierung hepatischer Sternzellen und portaler Fibroblasten in eine dem Myofibroblasten ähnlichen Phänotyp initiieren und aufrechterhalten. Dieser Phänotyp weist gegenüber den Ursprungszellen eine gesteigerte Proliferationsrate und Matrixsynthese bei häufig gleichzeitig reduziertem Abbau Extrazellulärer Matrix (Fibrolyse) durch matrixabbauende Proteasen auf. Die Ausschüttung dieser Faktoren kann dabei durch andere Zellen der Leber als die hepatischen Sternzellen oder portalen Fibroblasten erfolgen.

Bei einer vorteilhaften Ausgestaltung ist das Gen ein Gen, welches kodiert für den Bindegewebewachstumsfaktor CTGF (connective tissue growth factor), transformierenden Wachstumsfaktor  $\beta$  TGF $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ), insbesondere TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 oder TGF $\beta$ 3, TGF  $\beta$ -Rezeptor Typ I oder Typ II, die Signaltransduktoren Smad 2, Smad 3 oder Smad 4, SARA (smad anchor for receptor activation), PDGF, Oncostatin M, ein an der Bildung von Kollagen-Fibrillen beteiligtes Gen, ein Prokollagen, Prolyl-4-Hydroxylase, Lysyl-Hydroxylase, Lysyl-Oxidase, N-Propeptidase oder C-Propeptidase. Smad 2, Smad 3, Smad 4 und SARA sind an der durch Bindung von TGF  $\beta$  an den TGF $\beta$ -Rezeptor Typ I oder Typ II ausgelösten Signaltransduktion beteiligt. Prolyl-4-Hydroxylase, Lysyl-Hydroxylase, Lysyl-Oxidase, N-Propeptidase und C-Propeptidase sind an der Bil-

dung von Kollagen-Fibrillen aus Prokollagen, einem Vorläufermolekül, beteiligt. Die N-Propeptidase spaltet dabei von einem Prokollagen ein N-terminales Propeptid und die C-Propeptidase ein C-terminales Propeptid ab.

5

Besonders vorteilhaft ist es, wenn es sich bei dem Prokollagen um eines der Prokollagene vom Typ  $\alpha 1(I)$ ,  $\alpha 2(I)$ ,  $\alpha 1(II)$ ,  $\alpha 1(III)$ ,  $\alpha 1(V)$ ,  $\alpha 2(V)$ ,  $\alpha 3(V)$ ,  $\alpha 1(VI)$ ,  $\alpha 2(VI)$ ,  $\alpha 3(VI)$ ,  $\alpha 1(XI)$ ,  $\alpha 2(XI)$  oder  $\alpha 3(XI)$  handelt. Dabei bezeichnet die in Klammer gesetzte römische Ziffer jeweils den Typ des aus dem Prokollagen gebildeten Kollagens. Die arabische Ziffer kennzeichnet jeweils die Kette des Prokollagens.

Bei der fibrotischen Erkrankung kann es sich z.B. um eine Leberfibrose, eine Fibrose der Niere oder der Lunge, beispielsweise nach einer Verletzung, oder eine über die für eine Heilung erforderlich Narbenbildung hinausgehende Bildung von Narbengewebe handeln.

Vorzugsweise weist ein Strang S1 der dsRNA einen zu dem Gen zumindest abschnittsweise komplementären, insbesondere aus weniger als 25 aufeinander folgenden Nukleotiden bestehenden, Bereich auf. Unter dem "Gen" wird hier der DNA-Strang der doppelsträngigen für ein Protein oder Peptid kodierenden DNA verstanden, welcher komplementär zu einem bei der Transkription als Matrize dienenden DNA-Strang einschließlich aller transkribierten Bereiche ist. Bei dem Gen handelt es sich also im Allgemeinen um den Sinn-Strang. Der Strang S1 kann somit komplementär zu einem bei der Expression des Gens gebildeten RNA-Transkript oder dessen Prozessierungsprodukt, wie z.B. einer mRNA, sein. Das Protein oder Peptid ist dabei ein solches, welches an der Bildung von Extrazellulärer Matrix beteiligt ist.

Der komplementäre Bereich der dsRNA kann 19 bis 24, bevorzugt 20 bis 24, besonders bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22 oder 23, Nukleotide aufweisen. Eine dsRNA mit dieser Struktur

ist besonders effizient in der Inhibition des Gens. Der Strang S1 der dsRNA kann weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, insbesondere 23, Nukleotide aufweisen. Die Zahl dieser Nukleotide ist zugleich  
5 die Zahl der in der dsRNA maximal möglichen Basenpaare.

Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, wenn zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang auf-  
10 weist. Eine solche dsRNA weist gegenüber einer dsRNA ohne einzelsträngige Überhänge an mindestens einem Ende eine bessere Wirksamkeit bei der Hemmung der Expression des Gens auf. Ein Ende ist dabei ein Bereich der dsRNA, in welchem ein 5'- und ein 3'-Strangende vorliegen. Eine nur aus dem Strang S1  
15 bestehende dsRNA weist demnach eine Schleifenstruktur und nur ein Ende auf. Eine aus dem Strang S1 und einem Strang S2 gebildete dsRNA weist zwei Enden auf. Ein Ende wird dabei jeweils von einem auf dem Strang S1 und einem auf dem Strang S2 liegenden Strangende gebildet.

20

Vorzugsweise befindet sich der einzelsträngige Überhang am  
3'-Ende des Strangs S1. Diese Lokalisation des einzelsträngigen Überhangs führt zu einer weiteren Steigerung der Effizienz des Medikaments. In einem Ausführungsbeispiel weist die  
25 dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang auf. Das andere Ende ist bei einer zwei Enden aufweisenden dsRNA glatt, d.h. ohne Überhänge, ausgebildet. Überraschenderweise hat es sich gezeigt, dass zur Verstärkung der Interferenz-  
30 Wirkung der dsRNA ein Überhang an einem Ende der dsRNA ausreichend ist, ohne dabei die Stabilität in einem solchen Maße zu erniedrigen wie durch zwei Überhänge. Eine dsRNA mit nur einem Überhang hat sich sowohl in verschiedenen Zellkulturmedien als auch in Blut, Serum und Zellen als hinreichend be-  
35 ständig und besonders wirksam erwiesen. Die Hemmung der Expression ist besonders effektiv, wenn sich der Überhang am 3'-Ende des Strangs S1 befindet.

Vorzugsweise weist die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 auf, d.h. sie ist aus zwei separaten Einzelsträngen gebildet. Besonders wirksam ist das Medikament, wenn der Strang S1 (Antisinn-Strang) eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 einen aus zwei Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist. Das am 5'-Ende des Strangs S1 gelegene Ende der dsRNA ist dabei glatt ausgebildet. Der Strang S1 kann zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Gens komplementär sein. Vorzugsweise besteht die dsRNA aus dem Strang S2 mit der Sequenz Nr. 3 und dem Strang S1 mit der Sequenz Nr. 4 oder dem Strang S2 mit der Sequenz Nr. 5 und dem Strang S1 mit der Sequenz Nr. 6 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll. Eine solche dsRNA ist in der Hemmung der Expression des für Prokollagen vom Typ  $\alpha 1(I)$  oder CTGF kodierenden an der Bildung Extrazellulärer Matrix beteiligten Gens besonders wirksam.

Das Medikament kann eine Zubereitung aufweisen, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur intravenösen oder intraperitonealen Infusion oder Injektion oder zur Infusion oder Injektion direkt in ein von der fibrotischen Erkrankung betroffenes Gewebe, geeignet ist. Eine zur Inhalation, Infusion oder Injektion geeignete Zubereitung kann im einfachsten Fall, insbesondere ausschließlich, aus einem physiologisch verträglichen Lösungsmittel, vorzugsweise einer physiologischen Kochsalzlösung oder einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA bestehen. Es hat sich nämlich überraschenderweise herausgestellt, dass eine lediglich in einem solchen Puffer oder Lösungsmittel gelöste und verabreichte dsRNA von den das Gen exprimierenden Zellen aufgenommen wird. Die Expression des Gens und damit die Erkrankung wird dadurch gehemmt, ohne dass die dsRNA dazu in einem besonderen Vehikel verpackt sein muss. Die dsRNA kann in dem Medikament in einer Lösung, insbesondere einem physio-

logisch verträglichen Puffer oder einer physiologischen Kochsalzlösung, von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Kapsid, einem Kapsoid oder einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden vorliegen. Der physiologisch verträgliche Puffer kann eine phosphatgepufferte Salzlösung sein. Eine micellare Struktur, ein Kapsid, ein Kapsoid oder eine polymere Nano- oder Mikrokapsel kann die Aufnahme der dsRNA in die das Gen exprimierenden Zellen erleichtern. Die polymere Nano- oder Mikrokapsel besteht aus mindestens einem biologisch abbaubaren Polymer, z.B. Polybutylcyanoacrylat. Die polymere Nano- oder Mikrokapsel kann darin enthaltene oder daran gebundene dsRNA im Körper transportieren und freisetzen.

Die dsRNA kann mit einem Mittel kombiniert sein, welches eine gezielte Aufnahme der dsRNA in Zellen eines von der fibrotischen Erkrankung betroffenen Organs, insbesondere der Leber, der Niere, der Lunge oder der Haut, ermöglicht. Kombiniert heißt dabei, dass die dsRNA an das Mittel gebunden oder, wie beispielsweise im Fall der Liposomen oder der Nano- oder Mikrokapseln, davon umgeben sein kann. In die Liposomen oder die Nano- oder Mikrokapseln können dabei Moleküle eingebettet sein, welche die gezielte Aufnahme, ein so genanntes Targeting, ermöglichen. Bevorzugt handelt es sich bei dem Mittel um ein Mittel, welches eine Bindung an den Kollagen Typ VI-Rezeptor oder den PDGF $\beta$ -Rezeptor, insbesondere von hepatischen Sternzellen oder Myofibroblasten, vermittelt. Die hepatischen Sternzellen oder Myofibroblasten können aktiviert sein. Für den Kollagen Typ VI-Rezeptor ist das zyklische Peptid C\*GRGDSPC\* gemäß Sequenz Nr. 25 des anliegenden Sequenzprotokolls besonders gut geeignet. Dabei steht C\* für Cysteinreste, welche durch eine Disulfidbindung den Ringschluss des Peptids bewirken.

Vorzugsweise liegt das Medikament in mindestens einer Verabreichungseinheit vor, welche die dsRNA in einer Menge ent-



hält, die eine Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens 2,5 mg, bevorzugt höchstens 200 µg, besonders bevorzugt höchstens 100 µg, vorzugsweise höchstens 50 µg, insbesondere höchstens 25 µg, pro kg Körpergewicht und Tag ermöglicht. Es hat es sich nämlich erstaunlicherweise gezeigt, dass die dsRNA bereits in dieser pro Tag verabreichten Dosierung eine ausgezeichnete Effektivität in der Hemmung der Expression des Gens aufweist und antifibrotisch wirksam ist. Die Verabreichungseinheit kann für eine einmalige Verabreichung bzw. Einnahme pro Tag konzipiert sein. Dann ist die gesamte Tagesdosis in einer Verabreichungseinheit enthalten. Ist die Verabreichungseinheit für eine mehrmalige Verabreichung bzw. Einnahme pro Tag konzipiert, so ist die dsRNA darin in einer entsprechend geringeren Menge enthalten, die das Erreichen der Tagesdosis ermöglichenden Menge enthalten. Die Verabreichungseinheit kann auch für eine einzige Verabreichung bzw. Einnahme für mehrere Tage konzipiert sein, z. B. indem die dsRNA über mehrere Tage freigesetzt wird. Die Verabreichungseinheit enthält dann ein entsprechend Mehrfaches der Tagesdosis. Die dsRNA ist in der Verabreichungseinheit in einer zu der Hemmung der Expression eines an der Bildung von Extrazellulärer Matrix beteiligten Gens ausreichenden Menge enthalten. Das Medikament kann auch so konzipiert sein, dass mehrere Einheiten des Medikaments zusammen die ausreichende Menge in der Summe enthalten. Die ausreichende Menge kann auch von der pharmazeutischen Formulierung der Verabreichungseinheit abhängen. Zur Ermittlung einer ausreichenden Menge kann die dsRNA in steigenden Mengen bzw. Dosierungen verabreicht werden. Danach kann an einer aus dem von der fibrotischen Erkrankung betroffenen Gewebe entnommenen Probe mit bekannten Methoden ermittelt werden, ob bei dieser Menge eine Hemmung der Expression des genannten Gens eingetreten ist. Bei den Methoden kann es sich z.B. um molekularbiologische, biochemische oder immunologische Methoden handeln.

Erfindungsgemäß ist weiterhin die Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure zur Herstellung eines Medikaments

zur Behandlung einer fibrotischen Erkrankung vorgesehen, wobei die dsRNA durch RNA-Interferenz zur Hemmung der Expression eines an der Bildung von Extrazellulärer Matrix beteiligten Gens geeignet ist. Weiterhin ist erfindungsgemäß die Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure zur Behandlung einer fibrotischen Erkrankung vorgesehen, wobei die dsRNA durch RNA-Interferenz zur Hemmung der Expression eines an der Bildung von Extrazellulärer Matrix beteiligten Gens geeignet ist. Weiterhin ist eine doppelsträngige Ribonukleinsäure vorgesehen, welche durch RNA-Interferenz zur Hemmung der Expression eines an der Bildung von Extrazellulärer Matrix bei einer fibrotischen Erkrankung beteiligten Gens als Wirkstoff geeignet ist.

Wegen der weiteren vorteilhaften Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Verwendungen und der erfindungsgemäßen dsRNA wird auf die vorangegangenen Ausführungen verwiesen.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Zeichnungen beispielhaft erläutert. Es zeigen:

- Fig. 1 Die relativen Prokollagen  $\alpha 1(I)$ -Transkriptspiegel von RD-Zellen in Abhängigkeit von der zur Behandlung eingesetzten Menge Prokollagen  $\alpha 1(I)$ -spezifischer dsRNA,
- Fig. 2 die relativen CTGF-Transkriptspiegel von RD-Zellen in Abhängigkeit von der zur Behandlung eingesetzten Menge an CTGF-spezifischer dsRNA,
- Fig. 3 die relativen CTGF-Transkriptspiegel von CFSC-2G-Zellen in Abhängigkeit von der zur Behandlung eingesetzten Menge CTGF-spezifischer dsRNA und
- Fig. 4 die relativen CTGF-Transkriptspiegel von aus Ratten isolierten hepatischen Sternzellen in Abhängigkeit

von der Behandlung mit einer CTGF-spezifischen dsRNA.

Für die Experimente wurden zur transienten Transfektion die  
5 folgenden doppelsträngigen Oligoribonukleotide mit den Sequenzen Nr. 1 bis Nr. 6 gemäß dem Sequenzprotokoll eingesetzt:

10 HCV s5/as5, deren Strang S1 zu einer Sequenz aus dem Genom des Hepatitis C-Virus (HCV) komplementär ist:

S2: 5'- acg gcu agc ugu gaa ugg ucc gu-3' (Sequenz Nr. 1)

S1: 3'-ag ugc cga ugc aca cuu acc agg -5' (Sequenz Nr. 2)

15 PCA1+2, deren Strang S1 zu einer Sequenz aus dem humanen Prokollagen  $\alpha 1(I)$ -Gen und dem dazu in diesem Bereich 100 %ig homologen Prokollagen  $\alpha 1(I)$ -Gen aus Rattus norvegicus komplementär ist:

20 S2: 5'- caa gag ccu gag cca gca gau cg-3' (Sequenz Nr. 3)

S1: 3'-ga guu cuc gga cuc ggu cgu cua -5' (Sequenz Nr. 4)

CTG1+2, deren Strang S1 zu einer Sequenz aus dem humanen CTGF-Gen und dem dazu in diesem Bereich 100 %ig homologen  
25 CTGF-Gen aus Rattus norvegicus komplementär ist:

S2: 5'- ccu gug ccu gcc auu aca acu gu-3' (Sequenz Nr. 5)

S1: 3'-cu gga cac gga cgg uaa ugu uga -5' (Sequenz Nr. 6)

30 Für die Experimente wurden folgende Zellen eingesetzt:

- RD-Zellen: Dabei handelt es sich um Zellen einer humanen embryonalen Rhabdomyosarkomzelllinie. Die Zelllinie ist unter der Nummer CCL136 bei der American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, USA zu  
35 beziehen.

- CFSC-2G-Zellen: Dabei handelt es sich um Zellen einer hepatischen Ratten-Sternzelllinie, welche von Dr. Marcos Rojkind (Liver Research Center, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York City, New York, USA) zur Verfügung gestellt worden ist. Die Isolierung der CFSC-Stammzellen ist beschrieben in: Laboratory Investigation 65 (1991), 644-53. Die Isolierung und Charakterisierung des Subklones CFSC-2G ist beschrieben in: Patricia Greenwel et al., Laboratory Investigation 69 (1993), 210-26.
- Primäre aus Rattenleber gemäß Knook, D. et al., Exp. Cell Res. 139 (1982), Seiten 468 bis 471 isolierte hepatische Sternzellen.
- Alle Zellen wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM) mit 862 mg/l L-Alanyl-L-Glutamin und 4,5 g/l Glucose der Firma Invitrogen GmbH, Technologiepark Karlsruhe, Emmy-Noether Strasse 10, D-76131 Karlsruhe mit Zusatz von 10 % hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum (FKS), 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Zellkulturmedium) kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C in einer feuchten Atmosphäre aus 8 % CO<sub>2</sub> und 92 % Luft.
- Eine transiente Transfektion der RD-Zellen mit dsRNA wurde durch Lipofektion mit DNA-beladenen Liposomen aus kationischen Lipiden erreicht. Dazu wurde ein Lipofectamine Plus-Reagenzien-Kit der Firma Invitrogen eingesetzt. Darin ist ein Lipofectamine- und ein Plus-Reagenz enthaltenden. Die Transfektion wurde jeweils vierfach parallel nach Herstellerangaben durchgeführt. Für eine Transfektion wurden ca. 70000 RD-Zellen/Loch in einer sterilen 12-Lochplatte ausgesät. Vierundzwanzig Stunden später wurden für jeweils zwei Löcher einer 12-Lochplatte 5 µl einer 20 µmol/l der jeweiligen dsRNA enthaltenden wässrigen Lösung in 100 µl DMEM verdünnt. Dazu wurden jeweils 10 µl Plus-Reagenz zugegeben, gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 µl einer frisch angesetzten 1:25-Verdünnung des Lipofectamine-

Reagenz in DMEM (entsprechend 240  $\mu\text{g}$  Lipidgemisch/ml) zugegeben, gemischt, und die Entstehung von DNA-beladenen Liposomen durch eine 15-minütige Inkubation bei RT ermöglicht. Danach wurde das Zellkulturmedium von den Zellen abgenommen und die  
5 Zellen jeweils zweimal mit 1 ml DMEM pro Loch gewaschen. Alle Transfektionsansätze wurden mit je 1 ml DMEM verdünnt und davon 0,6 ml/Loch auf die Zellen pipettiert (2 Löcher pro Ansatz). Nach 4-stündiger Inkubation im Brutschrank wurde in jedes Loch 1 ml Zellkulturmedium zugegeben und weitere 44  
10 Stunden inkubiert.

Zur transienten Transfektion von hepatischen Sternzellen und CFSC-2G Zellen wurde dsRNA mittels Oligofectamine der Firma Invitrogen in die Zellen eingebracht. Dazu wurden CFSG-2G  
15 oder aus Ratten isolierte hepatische Sternzellen in einer Dichte von 20000 Zellen/Loch in einer sterilen 12-Lochplatte ausgesät. Vierundzwanzig Stunden nach dem Aussäen wurden pro Ansatz 4  $\mu\text{l}$  Oligofectamine in 11  $\mu\text{l}$  DMEM verdünnt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Weiterhin wurden für jeden Ansatz (2 Löcher einer 12-Lochplatte) 5  $\mu\text{l}$  einer 20  $\mu\text{mol/l}$   
20 dsRNA enthaltenden wässrigen Lösung in 185  $\mu\text{l}$  DMEM verdünnt. Jeweils 15  $\mu\text{l}$  des vorverdünnten Oligofectamins wurde zu der verdünnten dsRNA pipettiert, gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden 1050  $\mu\text{l}$  DMEM zu den Ansätzen zugegeben. Von dem resultierenden Gemisch sind jeweils  
25 600  $\mu\text{l}$  auf die Zellen gegeben worden nachdem die Zellen zweimal mit 1 ml DMEM pro Loch gewaschen worden sind. Nach 4-stündiger Inkubation im Brutschrank wurde in jedes Loch 1 ml Zellkulturmedium zugegeben und 44 Stunden im Brutschrank in-  
30 kubiert.

Die Wirkung der dsRNA auf die Transkriptspiegel von an der Bildung von Extrazellulärer Matrix beteiligten Genen wurde bei allen untersuchten Zellen mittels quantitativer PCR be-  
35 stimmt. Nach den 44 Stunden im Brutschrank wurden die Zellen dazu aufgeschlossen und die enthaltene RNA mit dem Kit PeqGold RNAPure der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH, Carl-

Thiersch-Str. 2 b, D-91052 Erlangen, Bestell Nummer 30-1010, gemäß Herstellervorschrift isoliert.

Die Bildung von cDNA erfolgte, indem jeweils gleiche RNA-Mengen (100 - 1000 ng) zur Reversen Transkription mittels Superscript II der Firma Invitrogen GmbH, Technologiepark Karlsruhe, Emmy-Noether Strasse 10, D-76131 Karlsruhe, Katalog-Nummer 18064-014 eingesetzt wurden. Als Primer wurden 100 pmol Oligo-dT-Primer und 50 pmol random Primer verwendet. 10  $\mu$ l RNA (100 - 1000 ng), 0,5  $\mu$ l Oligo dT-Primer (100 pmol) und 1  $\mu$ l random Primer (50 pmol) wurden 10 min bei 70°C inkubiert und dann kurz auf Eis gelagert. Anschließend sind 7  $\mu$ l Reverse Transkriptase-Mix (4  $\mu$ l 5 x Puffer; 2  $\mu$ l 0,1 mol/l DTT; 1  $\mu$ l je 10 mmol/l dNTP), 1  $\mu$ l Superscript II und 1  $\mu$ l des Ribonuklease Inhibitors RNasin® der Firma Promega GmbH, Schildkrötstr. 15, D-68199 Mannheim zugesetzt worden. Das Gemisch ist für 10 min bei 25°C, dann für 1 Stunde bei 42°C und abschließend für 15 min bei 70°C gehalten worden.

Die Wirkung der dsRNA in damit transfizierten Zellen auf die Expression der für Prokollagen  $\alpha$ 1(I) und CTGF codierenden Gene wurde durch die Bestimmung der Menge des Transkripts (Transkriptspiegel) dieser Gene mittels quantitativer Echtzeit ("realtime") RT-PCR nachgewiesen. Dazu wurde von gleichen Volumina der gebildeten cDNA im "Light-Cycler" der Firma Roche Diagnostics GmbH gemäß dem "TaqMan"-Verfahren der Firma PerkinElmer, Ferdinand-Porsche-Ring 17, D-63110 Rodgau-Jügesheim, nach Herstellerangaben mittels des LightCycler Fast Start DNA Master Hybridization Probes -Kits der Firma Roche Diagnostics GmbH spezifische cDNA-Mengen quantifiziert. Die Detektion erfolgte über eine mit dem Fluorophor 6'-FAM (Carboxyfluorescein) am 5'-Ende und dem Löschmolekül TAMRA (Carboxy-tetra-methyl-Rhodamin) am 3'-Ende markierte Sonde. Dabei wird das Fluorophor mit Licht angeregt. Es überträgt die Anregungsenergie auf das in unmittel-

barer Nähe befindliche 3'-seitige Löschmolekül. Während der jeweiligen Extensionsphasen der PCR führt die 5'-3' Exonukleaseaktivität der Taq DNA Polymerase zur Hydrolyse der Sonde und damit zur räumlichen Trennung des Fluorophors vom

5 Löschmolekül. Die Fluoreszenz von 6'-FAM wird immer weniger stark gelöscht. Sie nimmt daher zu und wird quantitativ erfasst. Die Quantifizierung erfolgt über eine mit bekannten Transkriptmengen oder einer Verdünnungsreihe einer Referenz-

10 cDNA erstellten Standardkurve. Weiterhin wurde der Transkriptspiegel des Haushaltsgens  $\beta$ 2-Mikroglobulin bestimmt und zur Normierung verwendet.  $\beta$ 2-Mikroglobulin ist ein konstitutiv in konstanter Menge exprimiertes Protein. Die Menge an Prokollagen  $\alpha$  1(I)- oder CTGF-cDNA wurde als Verhältnis zur

15 Menge von  $\beta$ 2-Mikroglobulin-cDNA bestimmt und graphisch in den Figuren 1 bis 4 als relativer Transkriptspiegel dargestellt.

Zur Bestimmung der Transkriptspiegel von Prokollagen  $\alpha$ 1(I) und CTGF mittels Echtzeit RT-PCR in Rattenzellen sind folgende Primer und TaqMan Sonden verwendet worden:

20

Zielmolekül	5'-Primer	TaqMan Sonde mit 5'-FAM + 3'-TAMRA	3'-Primer
Prokollagen $\alpha$ 1(I)	TCCGGCTCCTGCTCCTCTTA	TTCTTGCCATGCGTCAGGAGGG	GTATGCAGCTGACTTCAGGGATGT
CTGF	ATCCCTGCGACCCACACAAG	CTCCCCGCCAACCGCAAGAT	CAACTGCTTTGGAAGGACTCGC
$\beta$ 2-Mikroglobulin	CCGATGTATATGCTTGCAGAGTTAA	AACCGTCACCTGGGACCGAGACATGTA	CAGATGATTCAGAGCTCCATAGA

Zur Bestimmung der Transkriptspiegel von Prokollagen  $\alpha$  1(I) und CTGF mittels Echtzeit RT-PCR in humanen Zellen sind folgende

25 Primer und TaqMan Sonden verwendet worden:

Zielmolekül	5'-Primer	TaqMan Sonde mit 5'-FAM + 3'-TAMRA	3'-Primer
Prokollagen $\alpha 1(I)$	CAGAAGAACTGGTACATCAGCAAGA	ACCGATGGATTCCAGTTCGAGTATGGC	GTCAGCTGGATGGCCACAT
CTGF	AACCGCAAGATCGGCGT	TGCACCGCCAAAGATGGTGCTC	CCGTACCACCGAAGATGCA
$\beta 2$ - Mikroglobulin	TGACTTTGTACAGCCCAAGATA	TGATGCTGCTTACATGTCTCGATCCA	AATCCAAATGCGGCATCTTC

Die Figuren 1 bis 4 zeigen die Wirkungen der dsRNA. Um bei den Experimenten eine konstante Transfektionseffizienz zu gewährleisten wurden alle Zellen jeweils mit 100 nmol/l dsRNA transfiziert. Dazu wurden 0 bis 100 nmol/l der spezifischen gegen Prokollagen  $\alpha 1(I)$  oder CTGF gerichteten dsRNA mit der unspezifischer dsRNA HCV s5/as5 auf eine Konzentration von 100 nmol/l ergänzt und in Zellen transfiziert. Der mit 0 nmol/l spezifischer dsRNA gemessene Transkriptspegel wurde willkürlich als 100% Wert definiert.

Die Ergebnisse für RD-Zellen, welche mit steigenden Konzentrationen gegen Prokollagen  $\alpha 1(I)$  gerichteter dsRNA transfiziert worden sind, sind in Fig. 1 dargestellt. Die Wirkung der dsRNA ist konzentrationsabhängig. Der Prokollagen  $\alpha 1(I)$ -Transkriptspegel konnte durch 100 nmol/l dsRNA PCA1+2 auf 20 % reduziert werden. Die Expression von  $\beta 2$ -Mikroglobulin wurde durch die dsRNA nicht verändert. Das zeigt die Spezifität der eingesetzten dsRNA.

20

Fig. 2 zeigt die relativen Transkriptspegel des CTGF-Gens in Abhängigkeit von der Konzentration der zur Transfektion eingesetzten dsRNA CTG1+2. Auch hier zeigt sich ein konzentrationsabhängiger Effekt, der eingesetzten dsRNA. 100 nmol/l dsRNA CTG1+2 reduzieren den Transkriptspegel auf 10%, während 50 nmol dsRNA den Transkriptspegel auf 32% der mit unspezifischer dsRNA HCV s5/as5 behandelten Zellen absenkt. Auch hier wird die Expression von  $\beta 2$ -Mikroglobulin nicht verändert.

30



Fig. 3 zeigt die relativen Transkriptspiegel des CTGF-Gens in CFSC-2G-Zellen 48 Stunden nach Transfektion. Auch hier zeigt sich eine konzentrationsabhängige Reduktion der Transkriptspiegel durch die eingesetzte dsRNA.

5

Fig. 4 zeigt die relativen Transkriptspiegel des CTGF-Gens in aus Ratten isolierten hepatischen Sternzellen bzw. Myofibroblasten. Die Zellen wurde 7 Tage auf Plastik kultiviert. Sie waren dadurch bereits aktiviert. 48 Stunden nach Transfektion mit 100 nmol/l dsRNA zeigte sich eine etwa 50%ige Reduktion der Transkription.

10

## Patentansprüche

1. Medikament zur Behandlung einer fibrotischen Erkrankung,  
wobei das Medikament eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) enthält, welche durch RNA-Interferenz zur Hemmung der Expression eines an der Bildung von Extrazellulärer Matrix beteiligten Gens geeignet ist.
2. Medikament nach Anspruch 1, wobei das Gen ein Gen ist, welches kodiert für CTGF, TGF $\beta$ , TGF $\beta$ -Rezeptor Typ I oder Typ II, Smad 2, Smad 3, Smad 4, SARA, PDGF, Oncostatin M, ein an der Bildung von Kollagen-Fibrillen beteiligtes Gen, ein Prokollagen, Prolyl-4-Hydroxylase, Lysyl-Hydroxylase, Lysyl-Oxidase, N-Propeptidase oder C-Propeptidase.
3. Medikament nach Anspruch 2, wobei das Prokollagen vom Typ  $\alpha 1(I)$ ,  $\alpha 2(I)$ ,  $\alpha 1(II)$ ,  $\alpha 1(III)$ ,  $\alpha 1(V)$ ,  $\alpha 2(V)$ ,  $\alpha 3(V)$ ,  $\alpha 1(VI)$ ,  $\alpha 2(VI)$ ,  $\alpha 3(VI)$ ,  $\alpha 1(XI)$ ,  $\alpha 2(XI)$  oder  $\alpha 3(XI)$  ist.
4. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die fibrotische Erkrankung eine Leberfibrose, eine Fibrose der Niere oder der Lunge oder eine über die für eine Heilung erforderliche Narbenbildung hinausgehende Bildung von Narbengewebe ist.
5. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zu dem Gen zumindest abschnittsweise komplementären, insbesondere aus weniger als 25 aufeinander folgenden Nukleotiden bestehenden, Bereich aufweist.
6. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der komplementäre Bereich 19 bis 24, bevorzugt 20 bis 24, besonders bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22 oder 23, Nukleotide aufweist.

7. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, insbesondere 23, Nukleotide aufweist.
- 5 8. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.
- 10 9. Medikament nach Anspruch 8, wobei sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1 befindet.
- 15 10. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang aufweist.
- 20 11. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 aufweist.
- 25 12. Medikament nach Anspruch 11, wobei der Strang S1 eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 einen aus zwei Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist, während das am 5'-Ende des Strangs S1 gelegene Ende der dsRNA glatt ausgebildet ist.
- 30 13. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Strang S1 zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Gens komplementär ist.
- 35 14. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA aus dem Strang S2 mit der Sequenz Nr. 3 und dem Strang S1 mit der Sequenz Nr. 4 oder dem Strang S2 mit der Sequenz Nr. 5 und dem Strang S1 mit der Se-

quenz Nr. 6 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll besteht.

- 5 15. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Medikament eine Zubereitung aufweist, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur intravenösen oder intraperitonealen Infusion oder Injektion oder zur Infusion oder Injektion direkt in ein von der fibrotischen Erkrankung betroffenes Gewebe, geeignet ist.  
10
16. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA in dem Medikament in einer Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer oder  
15 einer physiologischen Kochsalzlösung, von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Kapsid, einem Kapsoid oder einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden vorliegt.  
20
17. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA mit einem Mittel kombiniert ist, welches eine gezielte Aufnahme der dsRNA in Zellen eines von der fibrotischen Erkrankung betroffenen Organs, insbesondere  
25 der Leber, der Niere, der Lunge oder der Haut, ermöglicht.  
20
18. Medikament nach Anspruch 17, wobei das Mittel eine Bindung an den Kollagen Typ VI-Rezeptor oder den PDGFβ-Rezeptor, insbesondere von hepatischen Sternzellen oder  
30 Myofibroblasten, vermittelndes Mittel ist.
19. Medikament nach Anspruch 18, wobei das Mittel das zyklische Peptid C\*GRGDSPC\* ist.  
35
20. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Medikament in mindestens einer Verabreichungs-

einheit vorliegt, welche die dsRNA in einer Menge enthält, die eine Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens 2,5 mg, bevorzugt höchstens 200 µg, besonders bevorzugt höchstens 100 µg, vorzugsweise höchstens 50 µg, insbesondere höchstens 25 µg, pro kg Körpergewicht und Tag ermöglicht.

21. Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer fibrotischen Erkrankung, wobei die dsRNA durch RNA-Interferenz zur Hemmung der Expression eines an der Bildung von Extrazellulärer Matrix beteiligten Gens geeignet ist.
22. Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Behandlung einer fibrotischen Erkrankung, wobei die dsRNA durch RNA-Interferenz zur Hemmung der Expression eines an der Bildung von Extrazellulärer Matrix beteiligten Gens geeignet ist.
23. Verwendung nach Anspruch 21 oder 22, wobei das Gen ein Gen ist, welches kodiert für CTGF, TGFβ, TGFβ-Rezeptor Typ I oder Typ II, Smad 2, Smad 3, Smad 4, SARA, PDGF, Oncostatin M, ein an der Bildung von Kollagen-Fibrillen beteiligtes Gen, ein Prokollagen, Prolyl-4-Hydroxylase, Lysyl-Hydroxylase, Lysyl-Oxidase, N-Propeptidase oder C-Propeptidase.
24. Verwendung nach Anspruch 23, wobei das Prokollagen vom Typ α1(I), α2(I), α1(II), α1(III), α1(V), α2(V), α3(V), α1(VI), α2(VI), α3(VI), α1(XI), α2(XI) oder α3(XI) ist.
25. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 24, wobei die fibrotische Erkrankung eine Leberfibrose, eine Fibrose der Niere oder der Lunge oder eine über die für eine Heilung erforderliche Narbenbildung hinausgehende Bildung von Narbengewebe ist.

26. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 25, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum Gen zumindest abschnittsweise komplementären, insbesondere aus weniger als 25 aufeinander folgenden Nukleotiden bestehenden, Bereich aufweist.
27. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 26, wobei der komplementäre Bereich 19 bis 24, bevorzugt 20 bis 24, besonders bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22 oder 23, Nukleotide aufweist.
28. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 27, wobei der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, insbesondere 23, Nukleotide aufweist.
29. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 28, wobei zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.
30. Verwendung nach Anspruch 29, wobei sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1 befindet.
31. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 30, wobei die dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang aufweist.
32. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 31, wobei die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 aufweist.
33. Verwendung nach Anspruch 32, wobei der Strang S1 eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 einen aus zwei Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang

aufweist, während das am 5'-Ende des Strangs S1 gelegene Ende der dsRNA glatt ausgebildet ist.

34. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 33, wobei der  
5 Strang S1 zum primären oder prozessierten RNA-Transkript  
des Gens komplementär ist.
35. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 34, wobei die  
10 dsRNA aus dem Strang S2 mit der Sequenz Nr. 3 und dem  
Strang S1 mit der Sequenz Nr. 4 oder dem Strang S2 mit  
der Sequenz Nr. 5 und dem Strang S1 mit der Sequenz Nr.  
6 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll besteht.
36. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 35, wobei die  
15 dsRNA in einer Zubereitung vorliegt, die zur Inhalation,  
oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere  
zur intravenösen oder intraperitonealen Infusion oder  
Injektion oder zur Infusion oder Injektion direkt in ein  
von der fibrotischen Erkrankung betroffenes Gewebe, ge-  
20 eignet ist.
37. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 36, wobei die  
dsRNA in einer Lösung, insbesondere einem physiologisch  
verträglichen Puffer oder einer physiologischen Koch-  
25 salzlösung, von einer micellaren Struktur, vorzugsweise  
einem Liposom, einem Kapsid, einem Kapsoid oder einer  
polymeren Nano- oder Mikrokapsel umschlossen oder an ei-  
ner polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden vorliegt.
- 30 38. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 37, wobei die  
dsRNA oral, mittels Inhalation, Infusion oder Injektion,  
insbesondere intravenösen oder intraperitonealen Infusi-  
on oder Injektion oder Infusion oder Injektion direkt in  
ein von der fibrotischen Erkrankung betroffenes Gewebe,  
35 verabreicht wird.

39. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 38, wobei die dsRNA mit einem Mittel kombiniert ist, welches eine gezielte Aufnahme der dsRNA in Zellen eines von der fibrotischen Erkrankung betroffenen Organs, insbesondere der Leber, der Niere, der Lunge oder der Haut, ermöglicht.
40. Verwendung nach Anspruch 39, wobei das Mittel eine Bindung an den Kollagen Typ VI-Rezeptor oder den PDGF $\beta$ -Rezeptor, insbesondere von hepatischen Sternzellen oder Myofibroblasten, vermittelndes Mittel ist.
41. Verwendung nach Anspruch 40, wobei das Mittel das zyklische Peptid C\*GRGDSPC\* ist.
42. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 41, wobei die dsRNA in einer Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens 2,5 mg, bevorzugt höchstens 200  $\mu$ g, besonders bevorzugt höchstens 100  $\mu$ g, vorzugsweise höchstens 50  $\mu$ g, insbesondere höchstens 25  $\mu$ g, pro kg Körpergewicht und Tag verwendet wird.
43. Doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA), welche durch RNA-Interferenz zur Hemmung der Expression eines an der Bildung von Extrazellulärer Matrix bei einer fibrotischen Erkrankung beteiligten Gens geeignet ist.
44. DsRNA nach Anspruch 43, wobei das Gen ein Gen ist, welches kodiert für CTGF, TGF $\beta$ , TGF $\beta$ -Rezeptor Typ I oder Typ II, Smad 2, Smad 3, Smad 4, SARA, PDGF, Oncostatin M, ein an der Bildung von Kollagen-Fibrillen beteiligtes Gen, ein Prokollagen, Prolyl-4-Hydroxylase, Lysyl-Hydroxylase, Lysyl-Oxidase, N-Propeptidase oder C-Propeptidase..
45. DsRNA nach Anspruch 44, wobei das Prokollagen vom Typ  $\alpha$ 1(I),  $\alpha$ 2(I),  $\alpha$ 1(II),  $\alpha$ 1(III),  $\alpha$ 1(V),  $\alpha$ 2(V),  $\alpha$ 3(V),  $\alpha$ 1(VI),  $\alpha$ 2(VI),  $\alpha$ 3(VI),  $\alpha$ 1(XI),  $\alpha$ 2(XI) oder  $\alpha$ 3(XI) ist.



46. DsRNA nach einem der Ansprüche 43 bis 45, wobei die fibrotische Erkrankung eine Leberfibrose, eine Fibrose der Niere oder der Lunge oder eine unerwünschte Narbenbildung ist.
- 5
47. DsRNA nach einem der Ansprüche 43 bis 46, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zu dem Gen zumindest abschnittsweise komplementären, insbesondere aus weniger als 25 aufeinander folgenden Nukleotiden bestehenden, Bereich aufweist.
- 10
48. DsRNA nach einem der Ansprüche 43 bis 47, wobei der komplementäre Bereich 19 bis 24, bevorzugt 20 bis 24, besonders bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22 oder 23, Nukleotide aufweist.
- 15
49. DsRNA nach einem der Ansprüche 43 bis 48, wobei der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, insbesondere 23, Nukleotide aufweist.
- 20
50. DsRNA nach einem der Ansprüche 43 bis 49, wobei zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.
- 25
51. DsRNA nach Anspruch 50, wobei sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1 befindet.
- 30
52. DsRNA nach einem der Ansprüche 43 bis 51, wobei die dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang aufweist.
- 35
53. DsRNA nach einem der Ansprüche 43 bis 52, wobei die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 aufweist.

54. DsRNA nach Anspruch 53, wobei der Strang S1 eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 einen aus zwei Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist, während das am 5'-Ende des Strangs S1 gelegene Ende der dsRNA glatt ausgebildet ist.
55. DsRNA nach einem der Ansprüche 43 bis 54, wobei der Strang S1 zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Gens komplementär ist.
56. DsRNA nach einem der Ansprüche 43 bis 55, wobei die dsRNA aus dem Strang S2 mit der Sequenz Nr. 3 und dem Strang S1 mit der Sequenz Nr. 4 oder dem Strang S2 mit der Sequenz Nr. 5 und dem Strang S1 mit der Sequenz Nr. 6 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll besteht.
57. DsRNA nach einem der Ansprüche 43 bis 56, wobei die dsRNA in einer Zubereitung vorliegt, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur intravenösen oder intraperitonealen Infusion oder Injektion oder zur Infusion oder Injektion direkt in ein von der fibrotischen Erkrankung betroffenes Gewebe, geeignet ist.
58. DsRNA nach einem der Ansprüche 43 bis 57, wobei die dsRNA in einer Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer oder einer physiologischen Kochsalzlösung, von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Kapsid, einem Kapsoid oder einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden vorliegt.
59. DsRNA nach einem der Ansprüche 43 bis 58, wobei die dsRNA mit einem Mittel kombiniert ist, welches eine gezielte Aufnahme der dsRNA in Zellen eines von der fibro-

tischen Erkrankung betroffenen Organs, insbesondere der Leber, der Niere, der Lunge oder der Haut, ermöglicht.

- 5           60. DsRNA nach Anspruch 59, wobei das Mittel ein eine Bindung an den Kollagen Typ VI-Rezeptor oder den PDGF $\beta$ -Rezeptor, insbesondere von hepatischen Sternzellen oder Myofibroblasten, vermittelndes Mittel ist.
- 10           61. DsRNA nach Anspruch 60, wobei das Mittel das zyklische Peptid C\*GRGDSPC\* ist.

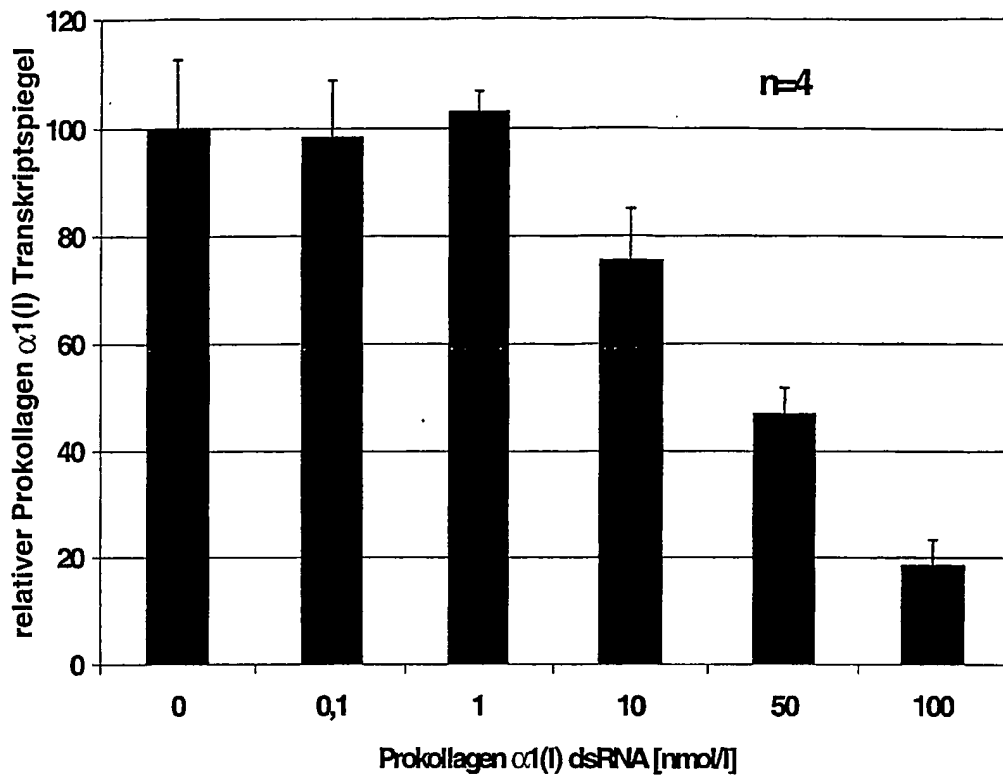


Fig.1

2/4

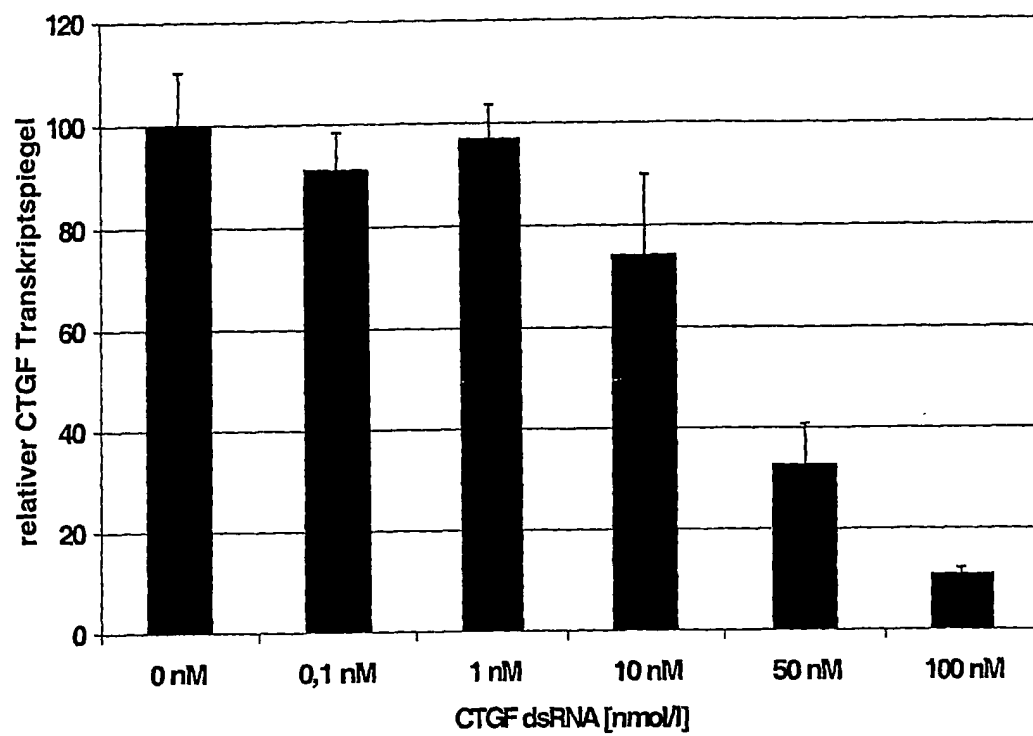


Fig. 2

3/4

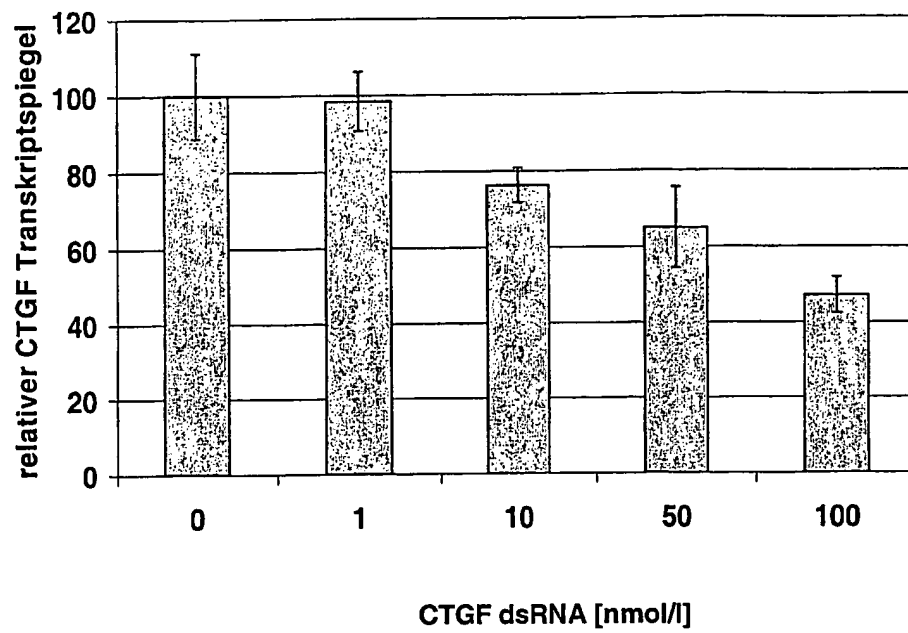


Fig. 3

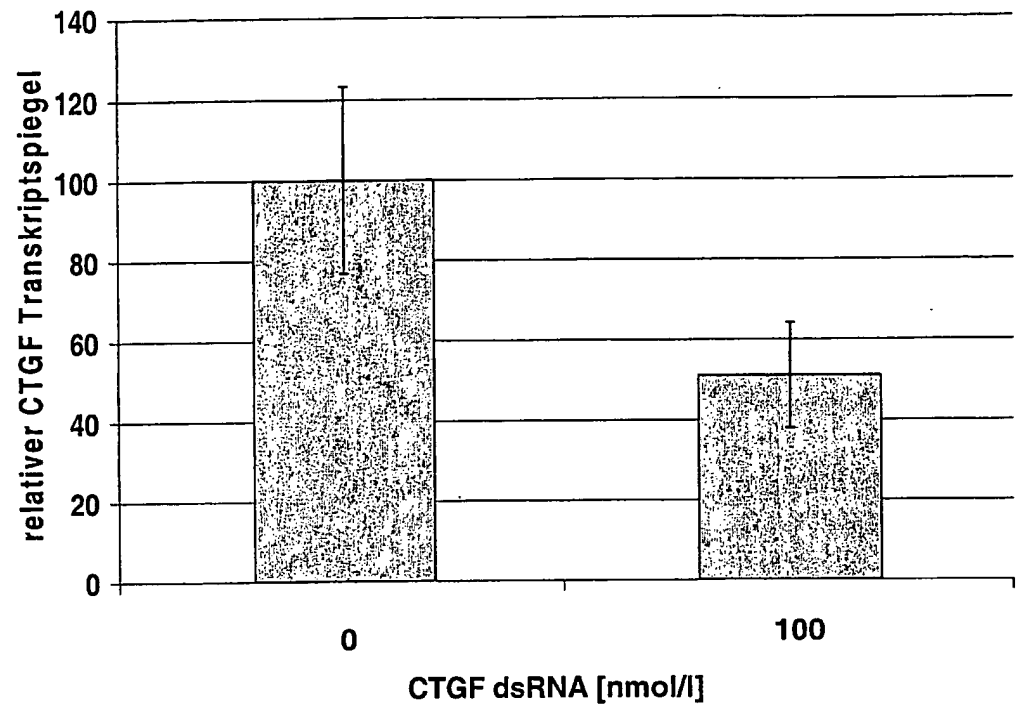


Fig. 4

1

## SEQUENZPROTOKOLL

5 <110> Ribopharma AG

10 <120> Medikament zur Behandlung einer fibrotischen Erkrankung

<130> 422394EH

15 <160> 25

20 <170> PatentIn version 3.1

25 <210> 1

<211> 23

<212> RNA

30 <213> Hepatitis C virus

35 <400> 1  
acggcuagcu gugaagguc cgu 23

40 <210> 2

<211> 23

<212> RNA

45 <213> Hepatitis C virus

50 <400> 2  
ggaccauuca cagcuagccg uga 23

<210> 3

55 <211> 23

<212> RNA

<213> Homo sapiens

60



	<400>	3		
5	caagagccug	agccagcaga	ucg	23
	<210>	4		
	<211>	23		
10	<212>	RNA		
	<213>	Homo sapiens		
15	<400>	4		
	aucugcuggc	ucaggcucuu	gag	23
20	<210>	5		
	<211>	23		
25	<212>	RNA		
	<213>	Homo sapiens		
30	<400>	5		
	ccugugccug	ccaauacaac	ugu	23
35	<210>	6		
	<211>	23		
	<212>	RNA		
40	<213>	Homo sapiens		
45	<400>	6		
	aguuguaaug	gcaggcacag	guc	23
	<210>	7		
50	<211>	20		
	<212>	DNA		
55	<213>	Rattus norvegicus		
	<400>	7		
60	tccggetect	gctcctotta		20

3

<210> 8  
5 <211> 23  
<212> DNA  
10 <213> Rattus norvegicus  
  
<400> 8  
15 ttcttggcca tgcgtcagga ggg 23  
  
<210> 9  
20 <211> 24  
<212> DNA  
<213> Rattus norvegicus  
25  
  
<400> 9  
gtatgcagct gacttcaggg atgt 24  
30  
<210> 10  
<211> 20  
35 <212> DNA  
<213> Rattus norvegicus  
  
40  
<400> 10  
atccctgcga cccacacaag 20  
  
45 <210> 11  
<211> 21  
<212> DNA  
50 <213> Rattus norvegicus  
  
55 <400> 11  
ctcccccgcc aaccgcaaga t 21  
  
60 <210> 12

4

<211> 22

<212> DNA

5 <213> Rattus norvegicus

<400> 12

10 caactgcttt ggaaggactc gc 22

<210> 13

15 <211> 25

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

20

<400> 13

25 ccgatgtata tgcttgca ga gttaa 25

<210> 14

<211> 27

30 <212> DNA

<213> Rattus norvegicus

35

<400> 14

40 aaccgtcacc tgggaccgag acatgta 27

<210> 15

<211> 23

45 <212> DNA

<213> Rattus norvegicus

50

<400> 15

55 cagatgattc agagctccat aga 23

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

60

S

&lt;213&gt; Homo sapiens

5 <400> 16  
cagaagaact ggtacatcag caaga 25

10 <210> 17

<211> 27

<212> DNA

15 <213> Homo sapiens

20 <400> 17  
accgatggat tccagttcga gtatggc 27

<210> 18

25 <211> 19

<212> DNA

30 <213> Homo sapiens

35 <400> 18  
gtcagctgga tggccacat 19

<210> 19

40 <211> 17

<212> DNA

<213> Homo sapiens

45

<400> 19  
aaccgcaaga tcggcgt 17

50

<210> 20

<211> 22

55 <212> DNA

<213> Homo sapiens

60

6

<400> 20  
tgcaccgccca aagatgggtgc tc 22

5 <210> 21  
<211> 19  
<212> DNA  
10 <213> Homo sapiens

15 <400> 21  
ccgtaccacc gaagatgca 19

20 <210> 22  
<211> 23  
<212> DNA  
25 <213> Homo sapiens

30 <400> 22  
tgactttgtc acagcccaag ata 23

<210> 23  
35 <211> 27  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
40

<400> 23  
45 tgatgctgct tacatgtctc gatccca 27

<210> 24  
<211> 20  
50 <212> DNA  
<213> Homo sapiens  
55

<400> 24  
aatccaaatg cggcatcttc 20  
60

1

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 8

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

10

&lt;400&gt; 25

Cys Gly Arg Gly Asp Ser Pro Cys  
1 5

15

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Application No.

PCT/EP 02/11972

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K31/713 C12N15/11 C12N15/88

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, SEQUENCE SEARCH

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ELBASHIR SAYDA M ET AL: "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs" GENES AND DEVELOPMENT, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, NEW YORK, US, vol. 15, no. 2, 15 January 2001 (2001-01-15), pages 188-200, XP002204651 ISSN: 0890-9369 the whole document --- -/--	1-18, 20-40, 42-60

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 March 2003

Date of mailing of the international search report

27/03/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Armandola, E

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No

PCT/EP 02/11972

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ELBASHIR SAYDA M ET AL: "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 411, no. 6836, 2001, pages 494-498, XP002206451 ISSN: 0028-0836 the whole document	1-18, 20-40, 42-60
Y	BASS BRENDA L: "Double-stranded RNA as a template for gene silencing" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, vol. 101, no. 3, 28 April 2000 (2000-04-28), pages 235-238, XP002194756 ISSN: 0092-8674 figure 1	1-18, 20-40, 42-60
Y	CAPLEN N J ET AL: "Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA. UNITED STATES 14 AUG 2001, vol. 98, no. 17, 14 August 2001 (2001-08-14), pages 9742-9747, XP002232936 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-18, 20-40, 42-60
Y	WO 01 75164 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); MASSACHUSETTS INSTITUTE) 11 October 2001 (2001-10-11) the whole document	1-18, 20-40, 42-60
Y	WO 00 27868 A (FIBROGEN INC) 18 May 2000 (2000-05-18)  page 22 -page 35; claims	1-18, 20-40, 42-60
Y	WO 01 19161 A (DEAN NICHOLAS M ;MURRAY SUSAN F (US); ISIS PHARMACEUTICALS INC (US)) 22 March 2001 (2001-03-22) the whole document	1-18, 20-40, 42-60
Y	WO 00 35936 A (UNIV MIAMI ;GROTENDORST GARY R (US)) 22 June 2000 (2000-06-22)  page 29 -page 34; claims 7,11	1-18, 20-40, 42-60

-/-



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int lional Application No  
PCT/EP 02/11972

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 95 00103 A (CHUNG HUN TAEG ;IL YANG PHARM CO LTD (KR)) 5 January 1995 (1995-01-05) the whole document ----	1-18, 20-40, 42-60
Y	HORIE S ET AL: "Inhibitory effects of antisense oligonucleotides on the expression of procollagen type III gene in mouse hepatic stellate cells transformed by simian virus 40." PATHOLOGY INTERNATIONAL. AUSTRALIA DEC 2000, vol. 50, no. 12, December 2000 (2000-12), pages 937-944, XP001146502 ISSN: 1320-5463 the whole document ----	1-18, 20-40, 42-60
P,Y	WO 02 44321 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); ELBASHIR SAYDA (DE);) 6 June 2002 (2002-06-06) the whole document ----	1-18, 20-40, 42-60
P,Y	ARIAS MONICA ET AL: "Adenoviral delivery of an antisense RNA complementary to the 3' coding sequence of transforming growth factor-beta1 inhibits fibrogenic activities of hepatic stellate cells." CELL GROWTH & DIFFERENTIATION: THE MOLECULAR BIOLOGY JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH. UNITED STATES JUN 2002, vol. 13, no. 6, June 2002 (2002-06), pages 265-273, XP002234560 ISSN: 1044-9523 the whole document ----	1-18, 20-40, 42-60
Y	WO 00 23113 A (SCHUPPAN DETLEF BRUNO IGOR ;BELJAARS ELEONORA (NL); MEIJER DIRK KL) 27 April 2000 (2000-04-27) page 4, line 20 -page 5, line 2; claims ----	19,41,61
Y	CARDARELLI P M ET AL: "The collagen receptor alpha 2 beta 1, from MG-63 and HT1080 cells, interacts with a cyclic RGD peptide." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. UNITED STATES 15 NOV 1992, vol. 267, no. 32, 15 November 1992 (1992-11-15), pages 23159-23164, XP002234561 ISSN: 0021-9258 the whole document -----	19,41,61

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
EP02/11972

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Although Claims 21-42 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/EP 02/11972

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0175164	A	11-10-2001	AU 3574402 A AU 4962201 A WO 0244321 A2 WO 0175164 A2 US 2002086356 A1	11-06-2002 15-10-2001 06-06-2002 11-10-2001 04-07-2002
WO 0027868	A	18-05-2000	US 6348329 B1 US 6358741 B1 AU 2146100 A CN 1332801 T EP 1127131 A2 JP 2002529066 T US 2002115156 A1 WO 0027868 A2 US 2002142353 A1	19-02-2002 19-03-2002 29-05-2000 23-01-2002 29-08-2001 10-09-2002 22-08-2002 18-05-2000 03-10-2002
WO 0119161	A	22-03-2001	AU 7489200 A WO 0119161 A2 US 6436909 B1	17-04-2001 22-03-2001 20-08-2002
WO 0035936	A	22-06-2000	AU 2181900 A AU 3121100 A CN 1334819 T CN 1334820 T EP 1140969 A1 EP 1140964 A2 JP 2002532082 T JP 2002532084 T WO 0035936 A1 WO 0035939 A2 US 6492129 B1	03-07-2000 03-07-2000 06-02-2002 06-02-2002 10-10-2001 10-10-2001 02-10-2002 02-10-2002 22-06-2000 22-06-2000 10-12-2002
WO 9500103	A	05-01-1995	KR 9705347 B1 AU 6984594 A EP 0737071 A1 JP 2548507 B2 JP 7099977 A WO 9500103 A2 US 5683988 A ZA 9404185 A	15-04-1997 17-01-1995 16-10-1996 30-10-1996 18-04-1995 05-01-1995 04-11-1997 08-02-1995
WO 0244321	A	06-06-2002	AU 3574402 A AU 4962201 A WO 0244321 A2 WO 0175164 A2 US 2002086356 A1	11-06-2002 15-10-2001 06-06-2002 11-10-2001 04-07-2002
WO 0023113	A	27-04-2000	WO 0023113 A1 AU 9560998 A CA 2345932 A1 EP 1117443 A1 JP 2002532384 T	27-04-2000 08-05-2000 27-04-2000 25-07-2001 02-10-2002

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/11972

<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> IPK 7 A61K31/713 C12N15/11 C12N15/88		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b> Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12N A61K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, SEQUENCE SEARCH		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	ELBASHIR SAYDA M ET AL: "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs" GENES AND DEVELOPMENT, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, NEW YORK, US, Bd. 15, Nr. 2, 15. Januar 2001 (2001-01-15), Seiten 188-200, XP002204651 ISSN: 0890-9369 das ganze Dokument --- -/--	1-18, 20-40, 42-60
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahellegend ist *A* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
13. März 2003		27/03/2003
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  Armandola, E

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/11972

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	ELBASHIR SAYDA M ET AL: "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, Bd. 411, Nr. 6836, 2001, Seiten 494-498, XP002206451 ISSN: 0028-0836 das ganze Dokument	1-18, 20-40, 42-60
Y	BASS BRENDA L: "Double-stranded RNA as a template for gene silencing" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, Bd. 101, Nr. 3, 28. April 2000 (2000-04-28), Seiten 235-238, XP002194756 ISSN: 0092-8674 Abbildung 1	1-18, 20-40, 42-60
Y	CAPLEN N J ET AL: "Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA. UNITED STATES 14 AUG 2001, Bd. 98, Nr. 17, 14. August 2001 (2001-08-14), Seiten 9742-9747, XP002232936 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument	1-18, 20-40, 42-60
Y	WO 01 75164 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); MASSACHUSETTS INSTITUTE) 11. Oktober 2001 (2001-10-11) das ganze Dokument	1-18, 20-40, 42-60
Y	WO 00 27868 A (FIBROGEN INC) 18. Mai 2000 (2000-05-18)  Seite 22 -Seite 35; Ansprüche	1-18, 20-40, 42-60
Y	WO 01 19161 A (DEAN NICHOLAS M ;MURRAY SUSAN F (US); ISIS PHARMACEUTICALS INC (US) 22. März 2001 (2001-03-22) das ganze Dokument	1-18, 20-40, 42-60
Y	WO 00 35936 A (UNIV MIAMI ;GROTENDORST GARY R (US)) 22. Juni 2000 (2000-06-22)  Seite 29 -Seite 34; Ansprüche 7,11	1-18, 20-40, 42-60
	-/--	

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int ionales Aktenzeichen

PCT/EP 02/11972

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
Y	WO 95 00103 A (CHUNG HUN TAEG ;IL YANG PHARM CO LTD (KR)) 5. Januar 1995 (1995-01-05) das ganze Dokument	1-18, 20-40, 42-60
Y	HORIE S ET AL: "Inhibitory effects of antisense oligonucleotides on the expression of procollagen type III gene in mouse hepatic stellate cells transformed by simian virus 40." PATHOLOGY INTERNATIONAL. AUSTRALIA DEC 2000, Bd. 50, Nr. 12, Dezember 2000 (2000-12), Seiten 937-944, XP001146502 ISSN: 1320-5463 das ganze Dokument	1-18, 20-40, 42-60
P,Y	WO 02 44321 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); ELBASHIR SAYDA (DE);) 6. Juni 2002 (2002-06-06) das ganze Dokument	1-18, 20-40, 42-60
P,Y	ARIAS MONICA ET AL: "Adenoviral delivery of an antisense RNA complementary to the 3' coding sequence of transforming growth factor-beta1 inhibits fibrogenic activities of hepatic stellate cells." CELL GROWTH & DIFFERENTIATION: THE MOLECULAR BIOLOGY JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH. UNITED STATES JUN 2002, Bd. 13, Nr. 6, Juni 2002 (2002-06), Seiten 265-273, XP002234560 ISSN: 1044-9523 das ganze Dokument	1-18, 20-40, 42-60
Y	WO 00 23113 A (SCHUPPAN DETLEF BRUNO IGOR ;BELJAARS ELEONORA (NL); MEIJER DIRK KL) 27. April 2000 (2000-04-27) Seite 4, Zeile 20 -Seite 5, Zeile 2; Ansprüche	19,41,61
Y	CARDARELLI P M ET AL: "The collagen receptor alpha 2 beta 1, from MG-63 and HT1080 cells, interacts with a cyclic RGD peptide." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. UNITED STATES 15 NOV 1992, Bd. 267, Nr. 32, 15. November 1992 (1992-11-15), Seiten 23159-23164, XP002234561 ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument	19,41,61

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 02/11972

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
  
Obwohl die Ansprüche 21-42 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt: \_\_\_\_\_

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 02/11972

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0175164 A	11-10-2001	AU 3574402 A	11-06-2002
		AU 4962201 A	15-10-2001
		WO 0244321 A2	06-06-2002
		WO 0175164 A2	11-10-2001
		US 2002086356 A1	04-07-2002
WO 0027868 A	18-05-2000	US 6348329 B1	19-02-2002
		US 6358741 B1	19-03-2002
		AU 2146100 A	29-05-2000
		CN 1332801 T	23-01-2002
		EP 1127131 A2	29-08-2001
		JP 2002529066 T	10-09-2002
		US 2002115156 A1	22-08-2002
		WO 0027868 A2	18-05-2000
		US 2002142353 A1	03-10-2002
WO 0119161 A	22-03-2001	AU 7489200 A	17-04-2001
		WO 0119161 A2	22-03-2001
		US 6436909 B1	20-08-2002
WO 0035936 A	22-06-2000	AU 2181900 A	03-07-2000
		AU 3121100 A	03-07-2000
		CN 1334819 T	06-02-2002
		CN 1334820 T	06-02-2002
		EP 1140969 A1	10-10-2001
		EP 1140964 A2	10-10-2001
		JP 2002532082 T	02-10-2002
		JP 2002532084 T	02-10-2002
		WO 0035936 A1	22-06-2000
		WO 0035939 A2	22-06-2000
		US 6492129 B1	10-12-2002
WO 9500103 A	05-01-1995	KR 9705347 B1	15-04-1997
		AU 6984594 A	17-01-1995
		EP 0737071 A1	16-10-1996
		JP 2548507 B2	30-10-1996
		JP 7099977 A	18-04-1995
		WO 9500103 A2	05-01-1995
		US 5683988 A	04-11-1997
		ZA 9404185 A	08-02-1995
WO 0244321 A	06-06-2002	AU 3574402 A	11-06-2002
		AU 4962201 A	15-10-2001
		WO 0244321 A2	06-06-2002
		WO 0175164 A2	11-10-2001
		US 2002086356 A1	04-07-2002
WO 0023113 A	27-04-2000	WO 0023113 A1	27-04-2000
		AU 9560998 A	08-05-2000
		CA 2345932 A1	27-04-2000
		EP 1117443 A1	25-07-2001
		JP 2002532384 T	02-10-2002